

Die Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat durch 2-Pyridinaldoximmethyljodid

Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes

von

Dieter Wenzel

aus

Reichenberg

1971 № 480

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Die Spaltung von o-Nitrophenylbutyrat durch 2-Pyridinaldoximmethyljodid

Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Dieter Wenzel

aus

Reichenberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. G. Koch
Referent:	Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Koreferent:	Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 9. 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	5
I. Hemmung der Cholinesterase durch Derivate organischer Phosphorsäureester	5
II. Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen ver- änderter Serumcholinesteraseaktivität ver- schiedener Genese und einer Alkylphosphatver- giftung	6
B) Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach der kolorimetrischen Methode von <u>Main</u> , <u>Miles</u> und <u>Braid</u> (1961)	7
C) Beispiele für die hydrolytische Spaltung von Organophosphaten und Anhydriden durch stickstoffhaltige Verbindungen	9
D) Problemstellung	11
E) Eigene Untersuchungen	12
I. Reagentien	12
II. Versuchsaufbau zur Prüfung des Umsatzes zwischen o- Nitrophenylbutyrat und 2- PAM	13
III. Untersuchung des Niederschlages	15
1. Mikroskopische Analyse	15
2. Schmelzpunktsbestimmung	15
3. UV-spektrophotometrische Untersuchungen	15
4. IR-spektrophotometrische Untersuchungen	18

	Seite
IV. Untersuchung der Reaktionslösung	19
1. Papierchromatographische Auftrennung der Reaktionslösung	19
2. UV-Spektralanalyse nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionslösung	21
3. IR-Spektralanalyse nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionslösung	23
4. Auswertung der Ergebnisse	25
V. Quantitative Untersuchungen	26
1. Anfertigung einer 2- PAM-Eichkurve	26
2. Anfertigung einer Eichkurve für die Reaktionslösung	27
3. Ergebnis	28
VI. Versuche zur Extrahierbarkeit der Reaktionslösung	29
1. Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln	29
2. Untersuchung der filtrierten Reaktionslösung durch Extraktion mit Methylenchlorid	30
a) Ergebnisse der UV-spektrophotometrischen Untersuchung	31
b) Papierchromatographische Auftrennung der beiden Phasen, gewonnen durch Extraktion der unveränderten Reaktionslösung mit Methylenchlorid	33
3. Ergebnis	33

	Seite
VII. Theoretische Überlegung über dem Umbau von 2- PAM	34
1. Vorbemerkung	34
2. Beckmann-Umlagerung	35
VIII. Untersuchung von Picolinsäure und 2-Amino- pyridin	38
1. UV-spektrophotometrische Untersuchung von Picolinsäure und 2- Aminopyridin	38
2. Auswertung der Ergebnisse	38
F) Diskussion	40
G) Zusammenfassung	43
H) Literaturverzeichnis	44

A) Einleitung

=====

I. Hemmung der Cholinesterase durch Derivate von organischen Phosphorsäureestern

Durch den ständig steigenden Gebrauch organischer Phosphorverbindungen als Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel in der Land- und Forstwirtschaft treten infolge fahrlässiger Anwendung oder suizidaler Absicht immer häufiger Vergiftungen auf. Bei diesen Alkylphosphaten wie z.B. E 605 handelt es sich um gut wirksame Kontakt-, Fraß- und Inhalationsgifte. Die Aufnahme der Stoffe ist über den Magendarmkanal, durch die Atmungsorgane und die unverletzte Haut möglich. Die gute Fett- und Lipoidlöslichkeit ist die Voraussetzung für ihre starke Wirkung.

Die Giftwirkung aller organischen Phosphorverbindungen beruht prinzipiell auf dem gleichen Mechanismus: Sie hemmen mehr oder weniger stark und lange die Cholinesterasen im Blut und in den Geweben, indem sie diese durch Phosphorylierung blockieren und somit die Spaltung des Überträgerstoffes Acetylcholin verhindern. Dadurch ergibt sich eine Anhäufung dieses Stoffes an autonomen und zentralen Synapsen sowie an der motorischen Endplatte und den postganglionären parasympathischen Nerven.

Klinisch haben wir ein muscarin- und nicotinähnliches Vergiftungsbild vor uns. Wir sprechen von einer "endogenen Acetylcholinvergiftung". Die klinischen Erscheinungen treten im allgemeinen erst auf, wenn die Serumcholinesterase um etwa 75 % gehemmt ist. Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität gibt somit ein genaueres Maß für den Grad der Vergiftung oder der Ex-

position an und dient zudem der Verlaufsbeobachtung einer Alkylphosphatvergiftung in der Klinik. Methodisch steht eine große Anzahl verschiedener Verfahren zur Verfügung, die nicht alle Acetylcholin als Substrat verwenden (Stumpf, Koelle).

II. Möglichkeit zur Unterscheidung veränderter Serumcholinesteraseaktivität verschiedener Genese und Alkylphosphatvergiftung

Der Serumcholinesterasespiegel gesunder Personen weist unabhängig vom Alter und Geschlecht einen recht konstanten Wert auf, zeigt aber zwischen den verschiedenen Einzelpersonen beträchtliche Unterschiede. Diese große individuelle Streubreite der Serumcholinesteraseaktivität wird zum Teil durch das Vorkommen genetisch bedingter atypischer Serumcholinesterasen, durch die Veränderung der Aktivität während verschiedener Krankheiten sowie durch die Einwirkung zahlreicher Pharmaka erklärt.

Hieraus ist ersichtlich, daß nicht nur Vergiftungen mit Alkylphosphaten die Cholinesteraseaktivität ändern. Es ist daher bedeutsam, eine Möglichkeit zu finden, Cholinesterasen, die durch Phosphorsäureester mehr oder weniger kompetitiv gehemmt sind, wieder zu reaktivieren. Friedberg und Sakai haben schon 1958 ein Verfahren zur in vitro- Reaktivierung alkylphosphatvergifteter Cholinesterase mit dem Antidot 2- PAM* ausgearbeitet. Sie schlagen vor, mit einer beliebigen Methode die Aktivität der Serumcholinesterase ohne und mit 2- PAM Zusatz zu prüfen. 2- PAM hat sich als ein besonders wirksamer

*2- Pyridinaldoximmethyljodid!

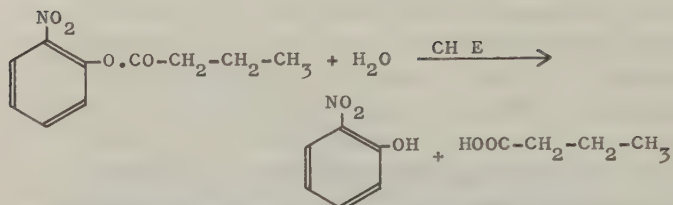
Reaktivator des phosphorylierten Enzyms erwiesen. Dieses quaternierte Pyridin-aldoxim geht unter physiologischen Bedingungen partiell über in ein resonanzstabilisiertes Betain, das befähigt ist, den Phosphorsäureesterrest vom Enzym zu übernehmen (Hagedorn, Gündel und Schoene (1969)). Ergebe sich nun nach dem Zuzügen von 2- PAM eine Aktivitätssteigerung, so liege mit Sicherheit eine Vergiftung mit einem organischen Phosphorsäureester vor.

Die Autoren verwendeten die manometrische Methode von Ammon (1934) unter Benutzung der Warburg-Apparatur, als Substrat diente Acetylcholin und 2- PAM als Reaktivator. Bei ihren Tierversuchen machten sie die Beobachtung einer spontanen Reaktivierung der Cholinesterase sowie einer abnehmenden Reaktivierbarkeit durch 2- PAM, wodurch die Zeitdauer der Nachweismöglichkeit begrenzt wird. Sucker (1966) hat die Möglichkeit der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Cholinesterasen durch 2- PAM mit zwei weiteren Verfahren, nämlich der elektrometrischen Messung der pH Wert-Änderung und der kolorimetrischen Bestimmung des unverbrauchten Substrates geprüft. Auch er arbeitete mit Acetylcholin als Substrat.

B) Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach der
kolorimetrischen Methode von Main, Miles und
Braid (1961)

Zur schnellen Bestimmung der Serumcholinesteraseaktivität entwickelten Main, Miles und Braid (1961) eine Methode mit o- Nitrophenylbutyrat als Substrat. Bei dieser kolorimetrischen Methode wird das schwach gelbe o- Nitrophenylbutyrat durch die Serumcholinesterase bei pH 7,6 in das kräftig gelbe o- Nitrophenol und in But-

tersäure gespalten:



Nach Herstellung einer Eichkurve für o- Nitrophenol bei 414 nm und pH 7,6 kann im Spektralphotometer die Aktivität der Serumcholinesterase direkt durch den Extinktionswert des abgespaltenen o- Nitrophenol bestimmt werden. Die kolometrische Methode ist einfach durchführbar und die Bestimmung beansprucht nur relativ kurze Zeit.

Das Blut, das im gerichtsmedizinischen Labor untersucht werden soll, ist häufig recht verschiedenartig. Zum Teil wird frisch entnommenes oder länger gelagertes Blut, zum Teil Blut mit oder ohne Zusatz von Antikoagulantien eingesandt. Bei der Prüfung der Leistungsfähigkeit der kolorimetrischen Methode von Main, Miles und Braid (1961) besonders unter den genannten gerichtsmedizinischen Gesichtspunkten konnte nach Untersuchungen von Geldmacher- v. Mallinckrodt und Kaiser (1968) folgendes festgestellt werden: bei einer Reaktivierung durch Alkylphosphate vergifteter Serumcholinesterasen mit 2- PAM, welche für die Beurteilung einer vorliegenden Vergiftung von Friedberg und Sakai (1958) empfohlen wurde, kann diese Testmethode nicht verwendet werden, da offensichtlich bereits 2- PAM allein in der Lage ist, aus o- Nitrophenylbutyrat das o- Nitrophenol abzuspalten. Da nicht festgestellt werden kann, ob der erhöhte Extinktionswert für o- Nitrophenol bei 414 nm nach Zusatz des Reaktivators 2- PAM auf Grund einer

Aktivitätssteigerung der Serumcholinesterase oder infolge der hydrolytischen Spaltung des Substrates o-Nitrophenylbutyrat auftritt, ist das kolorimetrische Schnellverfahren von Main, Miles und Braid (1961) für forensische Fragestellungen nur bedingt brauchbar.

C) Beispiele für die hydrolytische Spaltung von Organophosphaten und Anhydriden durch stickstoffhaltige Verbindungen

Nach diesen Ergebnissen stellte sich uns die Frage, in welcher Art und Weise 2- PAM in die Reaktion mit o- Nitrophenylbutyrat eintritt. Durch die Untersuchungen von Geldmacher - v.Mallinckrodt und Kaiser (1968), die einen Verbrauch von 1,5 Mol 2- PAM pro 1 Mol abgespaltenes o- Nitrophenol ermittelten, kann man annehmen, daß 2- PAM nicht als reiner Katalysator wirkt, sondern bei der Reaktion mit o- Nitrophenylbutyrat eine Verbindung eingeht, die es unwirksam macht. Die Autoren nahmen an, daß sich o- Nitrophenylbutyrat nicht wie ein Ester, sondern wie ein Anhydrid verhält.

Diese Reaktion ist kein völlig vereinzelt dastehendes Phänomen. Es ist bekannt, daß eine größere Anzahl von Organophosphaten und Anhydriden durch stickstoffhaltige Verbindungen gespalten werden:

So erfolgt z.B. die Beschleunigung der Hydrolyse von Diisopropylfluorphosphat (DFP) und Diäthylfluorphosphat in Gegenwart von Imidazol, Histidin, Pyridin und anderen ähnlich gebauten Verbindungen (Wagner-Jauregg und Hackley (1953)). Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine echte Katalyse, da bei der Hydrolyse von DFP durch Histidin und Imidazol nach Abschluß der Reaktion gleiche Konzentrationen gemessen wurden wie zu Beginn.

Die Autoren nahmen zunächst die Bildung eines intermediären Komplexes zwischen der stickstoffhaltigen Verbindung und DFP an, die dann sekundär zerfällt.

Jandorf (1956) fand, daß der Zerfall von Methylisopropylfluorophosphat (Sarin) bei Raumtemperatur und einem pH-Wert 7,5 rascher bei Gegenwart von Hydroxylamin verlief.

Green und Saville (1956) beschäftigten sich intensiv mit der beschleunigten Hydrolyse von Methylisopropylfluorophosphat (Sarin) in Gegenwart verschiedener Oxime. Die Autoren stellten fest, daß in neutraler oder schwach alkalischer Lösung für jedes gespaltene Mol Sarin ein Mol Oxim verbraucht wurde und daß für jedes verbrauchte Mol Oxim ein Mol Carboxylsäure gebildet wurde.

Ebenso fand Wagner-Jauregg (1956), daß die Freisetzung von Fluorwasserstoff aus Sarin durch verschiedene Hydroxamsäuren beschleunigt wird. Letztere bewirken auch eine beschleunigte Hydrolyse nicht nur von DFP und Sarin, sondern auch von Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und Tabun (Green, Sainsbury, Saville und Stansfield (1958)). Eine Beschleunigung der Spaltung von Phosdrin bei pH 9 verläuft etwa 3mal schneller, wenn Hydroxylamin oder verschiedene PAM-Derivate zugegen sind (Gatterdam, Casida und Stoutamire (1959)).

Die aufgeführten Organophosphatverbindungen können als einfache oder gemischte Säureanhydride aufgefaßt werden. Viele der genannten Stickstoffverbindungen, vor allem die Oxime reagieren auch mit anderen Säureanhydriden.

Hurd und Bauer beschrieben die Reaktion von p- Toluol-sulfonylchlorid mit Benzohydroxamsäure, wobei o- Phenylcarbamylbenzohydroxamat entstand. Hackley, Plapinger, Stolberg und Wagner-Jauregg (1955) nahmen hierfür denselben Reaktionsmechanismus an wie bei der Hydrolyse von DFP, da dabei dasselbe Reaktionsprodukt gebildet wurde.

Quantitative Untersuchungen über die Hydrolyse von DFP in Gegenwart verschiedener Hydroxamsäuren stammen ebenfalls von diesen Autoren. Sie fanden, daß bei Freisetzung von 1 Mol Fluorwasserstoff aus DFP 1,5 - 2 Mol Hydroxamsäuren aus dem Reaktionsansatz verschwanden. Green und Saville (1956) schließlich beschrieben die Freisetzung von Essigsäure aus Essigsäureanhydrid durch Hydroxyiminoaceton in neutraler Lösung. Die Autoren stellen dabei eine praktisch sofort einsetzende Hydrolyse mit Freisetzung eines einzelnen Mols Säure pro Katalysatormolekül fest. Daneben kommt es auch zu einer Abspaltung von Essigsäure aus dem gebildeten Oximacetat, allerdings erfordert dies eine längere Zeit. Dieser letztere Schritt läuft mit zunehmenden pH-Wert schneller ab.

D) Problemstellung

Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Reaktionsabläufe stellten wir uns die Aufgabe, die Reaktion zwischen o- Nitrophenylbutyrat und 2- PAM, die zur Spaltung des Säureanhydrides führt, genauer zu untersuchen.

E) Eigene Untersuchungen

I. Reagentien

2- PAM: Pyridin-2-aldoxim-N-methyljodid; wir verwendeten ein Präparat der Firma Bayer, Leverkusen, mit einem Schmelzpunkt von 215 - 216°C.

Phosphat-Puffer: 9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 160 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ werden mit Aqua dest. zu 1 Liter gelöst, so daß man einen 500 mM Phosphat-Puffer von einem pH-Wert 7,6 erhält. Diese Lösung wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

Butanol-Phosphat-Puffer: Zu 95 ml des 1:10 verdünnten Phosphat-Puffers werden 5 ml n-Butanol gegeben. Gemisch gut schütteln.

o- Nitrophenylbutyrat: Herstellung nach der Arbeitsvorschrift von Main, Miles und Braid (1961):

Zu einer 25 %igen Lösung von o- Nitrophenol in Methanol (10 ml) wird die doppelte äquivalente Menge einer 75 %igen NaOH (1,906 ml) unter ständigem Rühren langsam bei Raumtemperatur hinzugefügt. Das ausgefallene Na-Phenolat wird durch einen Büchner-Filter filtriert, dreimal mit einem kleinen Volumen Methanol und einmal mit Äther ausgewaschen und an der Luft getrocknet.

In einem Rundkolben wird zu dem Na- Phenolat Benzol zugegeben und geschüttelt (auf 0,01 Mol Na-Phenolat kommen 3 ml Benzol) und dann langsam Butyrylchlorid (0,014 Mol) bei Raumtemperatur hinzugefügt. Mit fortschreitender Reaktion bildet sich aus dem roten Na-Phenolat gelbes o- Nitrophenylbutyrat unter Ausfall von NaCl. Unter Rückfluß wird die Mischung eine Stunde vor-

sichtig gekocht. Nach Abkühlen wird dem Gemisch das dreifache Volumen Äther (15 ml) hinzugefügt und der Ansatz in einem Scheidetrichter überführt.

Die organische Phase wird zweimal mit Aqua dest., dreimal mit einer 1 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung, einmal mit einer 1 %igen Zitronensäurelösung und zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Dann wird die organische Phase in einen Erlenmeyerkolben überführt und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wird in ein Schälchen filtriert und vorsichtig über dem Wasserbad eingedampft.

Wir verzichteten auf eine Umkristallisation in Diäthyläther, da eine Reinheitsprüfung des o- Nitrophenylbutyrates im UV-Spektrophotometer keinen Hinweis auf eine Verunreinigung ergab. Das Präparat ist auch im Handel erhältlich (Firma Nutritional Biochemicals Corporation, 21010 Miles Avenue, Cleveland 28, Ohio).

II. Versuchsaufbau zur Prüfung des Umsatzes zwischen o- Nitrophenylbutyrat und 2- PAM

Die Versuchsbedingungen wurden ähnlich der von Stolberg, Tweit, Steinberg und Wagner-Jauregg (1955) beschriebenen Reaktion von Benzolsulfonylchlorid mit Benzohydroxamsäure gewählt.

Dabei wurde eine Suspension von 1,0 g (0,0072 Mol) Benzohydroxamsäure in 100 ml Wasser mit NaOH auf pH 7,6 eingestellt und die sich daraus ergebende Lösung auf 125 ml aufgefüllt. 1 ml (0,0073 Mol) Benzolsulfonylchlorid wurde bei konstant gehaltenem pH-Wert hinzugefügt. Nach 10 Minuten begann sich ein Niederschlag zu bilden, der innerhalb einer Stunde noch zunahm.

Nach drei Stunden Stehen wurde der Niederschlag filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Geringe Mengen von unlöslichem Diphenylharnstoff wurde nach Lösen des Rohproduktes in In NaOH abfiltriert; das Filtrat wurde dann mit In HCl angesäuert. Der resultierende Niederschlag betrug nach Trocknen 0,7 g.

Das Reaktionsprodukt, löslich in NaOH, NaHCO_3 , Alkohol und Äther, aber unlöslich in Wasser und wässriger Säure wurde isoliert und als o- Phenylcarbamylbenzohydroxamat $\text{C}_6\text{H}_5\text{CONHOCONHC}_6\text{H}_5$ identifiziert. Die Ausbeute betrug 75 % der Theorie.

Dasselbe Produkt konnte man erhalten, wenn man die 1/2 fache molare Menge Benzolsulfonylchlorid der Benzohydroxamsäure zufügte. Die Ausbeute wurde dadurch jedoch geringer (ca. 53 % der Theorie).

In Anlehnung an diese Vorschrift von Stolberg et al. (1955) wählten wir folgenden Versuchsaufbau:

Zu 325 mg (1,235 mM) 2- PAM in 20 ml Butanol-Phosphat-Puffer (pH 7,6) wurden 172 mg (0,824 mM) o- Nitrophenylbutyrat bei Raumtemperatur hinzugefügt. Diese Bedingungen entsprachen einem Verhältnis von 1,5 Mol 2- PAM zu 1 Mol o- Nitrophenylbutyrat, wie sie aus Untersuchungen von Geldmacher-v. Mallinckrodt und Kaiser (1968) hervorgingen.

Nach 3stündigem, kräftigem Schütteln bei Raumtemperatur fiel eine erhebliche Menge an gelben Niederschlag aus und wurde abfiltriert. Nach einem Tag schieden sich aus der Mutterlauge noch einzelne Kristalle ab.

III. Untersuchung des Niederschlages

Nach Filtration der Lösung wurde die Verbindung an der Luft getrocknet und eine Spatelspitze davon in gekühltem Methanol gelöst. Dann wurde mit kaltem Wasser umgefällt. Mit der erneut ausfallenden Verbindung wurden sämtliche folgenden Untersuchungen genauso durchgeführt wie vor dem Umfällen. Es ergaben sich dabei keine Unterschiede.

1. Mikroskopische Analyse

Die aus der Reaktionslösung ausgefallene Verbindung bestand aus kleinen, länglich quaderförmigen, gelben Bälkchen, die im polarisierten Licht nicht doppelbrechen. Beim Stehenlassen der frischen Reaktionslösung über Nacht fielen lange, feine, gelbe Nadeln aus.

2. Schmelzpunktsbestimmung

Der Schmelzpunkt der Analysensubstanz liegt bei 44,5 - 46°C. Der Mischschmelzpunkt der Analysensubstanz mit o- Nitrophenol-Reinsubstanz zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

3. UV-spektrophotometrische Untersuchungen

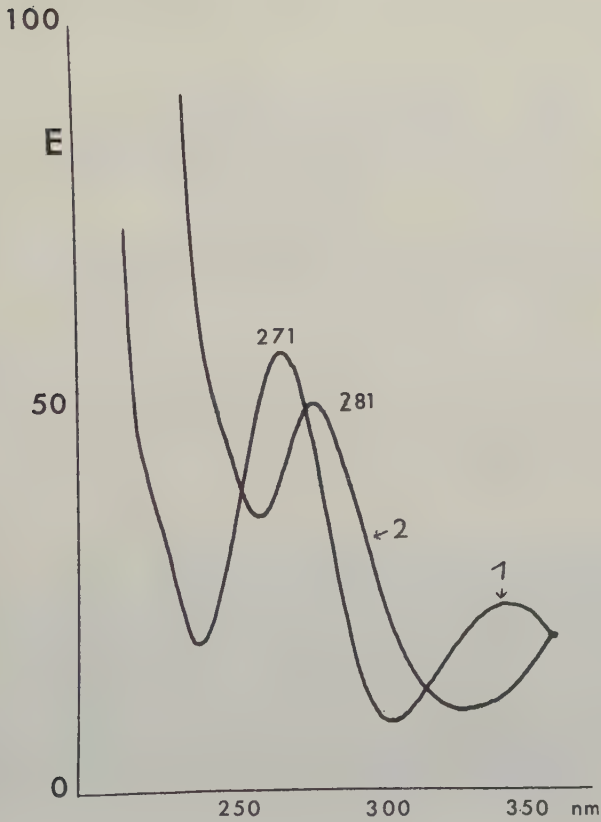
Alle UV-spektrophotometrischen Untersuchungen erfolgten mit dem selbstregistrierenden Spektrophotometer von Beckman, Modell DK 2.

- a) Die Verbindung wurde in Methanol gelöst;
Meßbereich: 360 - 220 nm; Vergleich: Methanol;
Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur
Absorptionsmaxima: 343 nm, 271 nm
Absorptionsminima: 306 nm, 243 nm

- b) Die Verbindung wurde in $2n \text{ NH}_3$ gelöst;
Meßbereich 360 - 220 nm; Vergleich: $2n \text{ NH}_3$;
Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur
Absorptionsmaximum: 281 nm
Absorptionsminima: 331 nm, 264 nm

Diese UV- Spektren stimmen völlig mit denen von
o- Nitrophenol-Reinsubstanz überein (Abb.1).

Abb.1:



Absorptions-Spektren von o- Nitrophenol

Das o- Nitrophenol- (nicht ionisiert) Spektrum
bei pH 5; Kurve 1

Das o- Nitrophenol- (ionisiert) Spektrum bei
pH 10; Kurve 2

4. IR-spektrophotometrische Untersuchungen

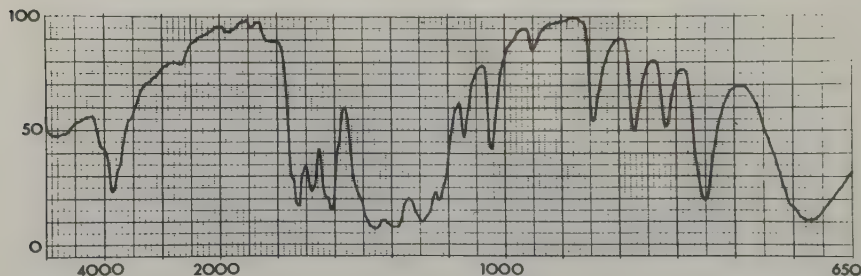
Zur Identifizierung der Substanz über die IR- Spektroskopie wurden die Spektralphotometer von Beckman, Modell IR 5a und 8 verwendet.

Die ausgefallene Verbindung wurde mit Kaliumbromid im Mörser verrieben. Die Probe wurde gegen einen Vergleichspreßling aus Kaliumbromid in einem Wellenlängenbereich von 4000 nm bis 650 nm gemessen.

Das IR-Spektrum deckt sich mit dem IR-Spektrum von o- Nitrophenol-Reinsubstanz (Abb. 2).

Abb.2:

IR-Spektrum der isolierten Verbindung und von o-Nitrophenol-Reinsubstanz



Diese Ergebnisse beweisen (Abb. 1 und 2), daß durch 2- PAM aus dem o- Nitrophenylbutyrat in einer Butanol-Phosphat-Pufferlösung sehr rasch o- Nitrophenol abgespalten wird.

IV. Untersuchung der Reaktionslösung

1. Papierchromatographische Auftrennung der Reaktionslösung

Verwendete Papiersorte Schleicher und Schüll 2043b.

Die Lösung des Reaktionsansatzes wurde nach dem Abfiltrieren der ausgefallenen Verbindung in verschiedenen Konzentrationen auf Papierchromatogramme aufgetragen. Als Laufmittel benützten wir

- a) Butanol-Ammoniak (125 ml 5n NH_3 + 1000 ml Butanol) nach Algeri und Walker (1952) und
- b) Butanol-Ameisensäure-Wasser (12 Teile Butanol + 7 Teile 15%ige Ameisensäure + 1 Teil Wasser) nach Jatzkewitz (1953).

Die Laufzeit betrug bei beiden Chromatogrammen jeweils 15 Stunden.

Nach dem Trocknen im Wärmeschrank ließen sich eine Fluoreszenz und mehrere Absorptionen unter der UV-Lampe abgrenzen (Abb. 3).

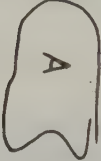
Abb. 3:

R_f 0,75 

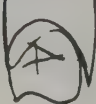
R_f 0,63 

 R_f 0,70

R_f 0,51 

 R_f 0,55
 R_f 0,45

R_f 0,35 
 R_f 0,28 
 R_f 0,20 
 R_f 0,11 

 R_f 0,23
 R_f 0,16
 R_f 0,07

Blatt a)

Blatt b)

Blatt a); Laufmittel: Butanol-Ammoniak

Blatt b); Laufmittel: Butanol-Ameisensäure-Wasser

2. UV-Spektralanalyse nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionslösung

Um die Absorptionen und Fluoreszenzen näher zu kennzeichnen, wurden die unter der UV-Lampe (254 nm) markierten Flecke des Chromatogrammes herausgeschnitten. Danach eluierten wir die Fraktionen des Papierchromatogrammes a) nach Entwicklung mit Butanol-Ammoniak als Laufmittel je nach Stärke der Absorption mit 2 - 5 ml Boratpuffer pH 10, die Fraktionen des Papierchromatogrammes b) nach Entwicklung mit Butanol-Ameisensäure-Wasser als Laufmittel mit 0,5 n H_2SO_4 .

Im selbst registrierenden Spektrophotometer von Beckman, Modell DK 2 zeichneten wir die Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 360 - 220 nm. Als Vergleich wählten wir das entsprechende Elutionsmittel, die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 1 cm; die Messung erfolgte bei Raumtemperatur.

Chromatogrammblatt a): Die Absorption mit einem R_f -Wert 0,11 wurde mit 5 ml Boratpuffer eluiert und mußte vor der Messung im Spektrophotometer 1 + 4 mit Boratpuffer verdünnt werden.

Absorptionsmaximum: 333 nm

Absorptionsminimum: 246 nm

Chromatogrammblatt b): Die Absorption mit einem R_f -Wert 0,23 wurde mit 5 ml 0,5 n H_2SO_4 eluiert und mußte vor der Messung im Spektrophotometer 1 + 4 mit 0,5 n H_2SO_4 verdünnt werden.

Absorptionsmaxima: 291 nm, 222 nm

Absorptionsminimum: 260 nm

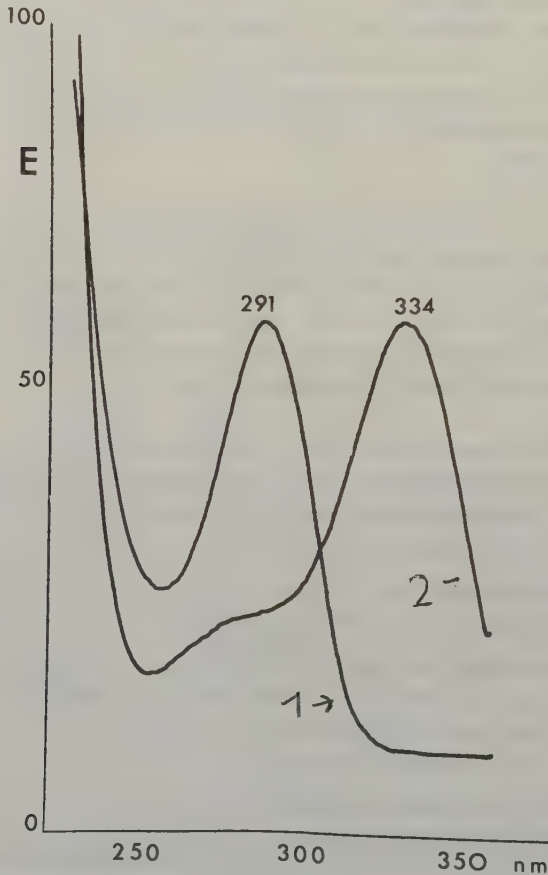
Nach Zufügen von conc. NaOH zum Eluat bis zu einem pH-Wert 10 ändert sich das Absorptions-Spektrum

Absorptionsmaximum: 332 nm

Absorptionsminimum: 256 nm

Diese Absorptions-Spektren stimmen mit denen von 2- PAM überein (Abb. 4).

Abb.4:



Absorptions-Spektren von 2- PAM

Das 2- PAM-Spektrum bei pH 5; Kurve 1

Das 2- PAM-Spektrum bei pH 10; Kurve 2

Die Absorption mit einem R_f -Wert von 0,47 sowie die Absorption mit einem R_f -Wert von 0,73 wurden eluiert und ihre Absorptions-Spektren gemessen. Der Kurvenverlauf erinnerte stark an Spektren von 2- PAM-Umlagerungsprodukten, auf die später näher einzugehen ist.

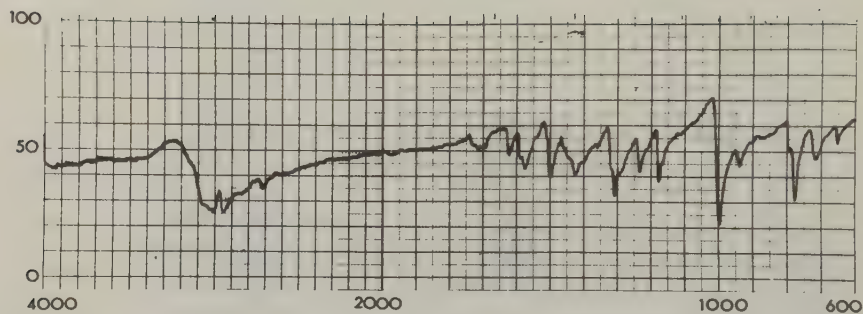
3. IR-Spektralanalyse nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionslösung

Zur sicheren Identifizierung der fraglichen Fraktionen wurde die filtrierte Reaktionslösung schichtweise auf ein Papierchromatogramm aufgetragen. Bei gleichen Laufmitteln wählten wir jetzt eine Laufzeit von 45 Stunden. Die unter der UV-Lampe abgrenzbaren breiten Absorptionen wurden mit je 10 ml Aqua dest. sorgfältig eluiert. Das Eluat wurde in ein Schälchen filtriert und über dem Wasserbad vorsichtig eingedampft. Die so gewonnenen Rückstände wurden für eine Bestimmung mit dem IR-Spektralphotometer von Beckman, Modell DK 8 verwendet.

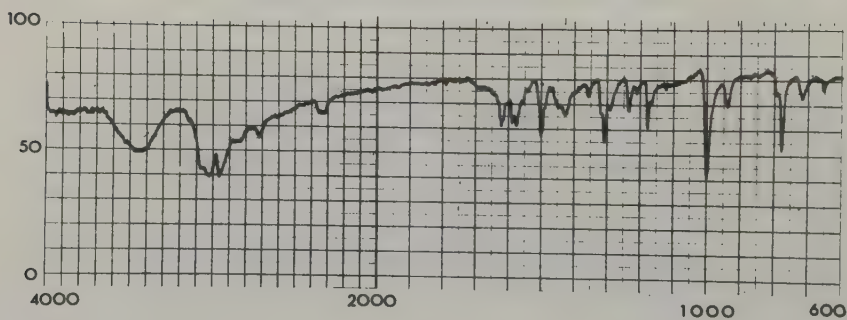
Die Schicht mit einem R_f -Wert 0,31 - 0,46 wies das IR-Spektrum der 2- PAM-Reinsubstanz auf, was durch ein Vergleichsspektrum gesichert werden konnte (Abb. 5).

Die IR-Spektren der anderen Schichten konnten nicht bewertet werden.

Abb.5:



a)



b)

IR-Spektrum a): IR-Spektrum der Schicht mit einem
R_f-Wert 0,31-0,46 (siehe Text)

IR-Spektrum b): 2- PAM- Reinsubstanz

4. Auswertung der Ergebnisse

Nach papierchromatographischer Auftrennung des Reaktionsansatzes von 325 mg (1,235 mM) 2- PAM und 172 mg (0,824 mM) o- Nitrophenylbutyrat in Butanol-Phosphat-Puffer (pH-Wert 7,6) mit verschiedenen Laufmitteln und verschieden langer Laufzeit, sowie nach UV- und IR- spektrophotometrischer Untersuchung der einzelnen Fraktionen können wir über den Reaktionsablauf folgendes sagen:

2- PAM ist in der Lage, unter den gewählten Bedingungen o- Nitrophenylbutyrat in o- Nitrophenol und Buttersäure zu spalten. Damit bestätigten sich die Untersuchungen von Geldmacher- v. Mallinckrodt und Kaiser (1968).

Bei der IR- Spektralanalyse konnte in der Mutterlauge nach erfolgter Auftrennung durch die Papierchromatographie nur 2- PAM sicher nachgewiesen werden. Die anderen Fraktionen der Chromatogramme konnten nicht identifiziert werden.

Nach Way, Brady und Tong (1966) muß eine Interpretation auf Grund papierchromatographischer Charakterisierung von 2- PAM und seiner Metabolite kritisch bewertet werden. Die Autoren konnten nämlich zeigen, daß die R_f -Werte von 2- PAM je nach dem Anionengehalt der Reaktionslösung erheblich differieren.

Ein weiteres Phänomen erschwert zudem eine Beurteilung der UV-Spektren. Schoene (1968) teilte mit, daß verschiedene Pyridinium-aldoxime wie z.B. auch 2- PAM in wässrig-alkalischer Lösung in ihrem Absorptionsmaximum konzentrationsabhängig sei. Der Autor deutete den Effekt so, daß sich oberhalb einer Grenzkonzentra-

tion Assoziat wachsender Polymerisationsgrade bilden. Die monomere Betainform, welche für die "Betainbande" (330 - 360 nm) verantwortlich gemacht wird, verschwindet dabei aus dem Gleichgewicht.

V. Quantitative Untersuchungen

In unserem Versuchsaufbau wählten wir ein molares Verhältnis von 1,5 Mol 2- PAM zu 1 Mol o- Nitro- phenylbutyrat. In der filtrierten Reaktionslösung konnten wir unverändertes 2- PAM nachweisen. Um Aussagen über den Gehalt an 2- PAM in der Lösung nach Abschluß der Reaktion machen zu können, gingen wir folgendermaßen vor:

1. Anfertigung einer 2- PAM-Eichkurve

Zur Anfertigung einer 2- PAM-Eichkurve lösten wir bekannte Mengen an 2- PAM in 0,5n H_2SO_4 und maßen die Extinktion im UV-Spektrophotometer. Für die quantitative Auswertung der Extinktion verwendeten wir das Absorptionsmaximum des 2- PAM bei 291 nm.

Meßbereich: 360 - 220 nm; Vergleich: 0,5n H_2SO_4 ;

Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur

Absorptionsmaxima: 291 nm, 222 nm

Absorptionsminima: 259 nm, 210 nm

Bei dem Absorptionsmaximum bei 291 nm ergaben sich für folgende 2-PAM-Mengen die Extinktionswerte:

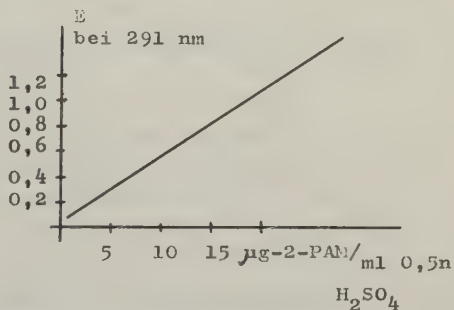
2- PAM Menge	Extinktion bei 291 nm
--------------	-----------------------

5 μg	0,32
-----------------	------

10 μg	0,56
------------------	------

15 μg	0,80
------------------	------

20 μg	1,10
------------------	------



Beim Alkalisieren durch Zusatz von conc. NaOH in die Untersuchungslösung erhielten wir ein neues UV-Spektrum:

Absorptionsmaximum: 332 nm

Absorptionsminimum: 253 nm

2. Anfertigung einer Eichkurve für die Reaktionslösung

Zur Anfertigung einer Eichkurve für die Reaktionslösung wurde wie oben verfahren. Steigende Konzentrationen des Reaktionsansatzes nach Abschluß der Reaktion wurden nach Filtration des o- Nitrophenol mit 0,5n H₂SO₄ so stark verdünnt, daß ihre maximale Absorption nicht den Extinktionswert von 2 überschreiten sollte.

Vergleich: 0,5n H₂SO₄; Meßbereich: 360 - 220 nm;

Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur

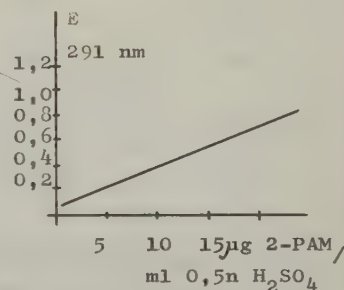
Absorptionsmaxima: 291 nm, 277 nm, 269 nm, 222 nm

Absorptionsminima: 286 nm, 251 nm, 209 nm

Bei dem Absorptionsmaximum bei 291 nm ergaben sich für folgende PAM-Mengen, die nach der eingesetzten Menge an 2-PAM in die Reaktionslösung berechnet wurden, folgende Extinktionswerte:

eingesetzte 2-PAM-Menge Extinktion bei 291 nm

5 μg	0,21
10 μg	0,36
15 μg	0,52
20 μg	0,68



Auch hier wurde zur Sicherung der Ergebnisse mit conc. NaOH alkalisiert und wir erhielten das UV-Spektrum wie oben:

Absorptionsmaximum: 332 nm

Absorptionsminimum: 253 nm

3. Ergebnis

Bei einem Vergleich beider Eichkurven miteinander konnte folgendes festgestellt werden:

5 μg 2-PAM entsprach unter den gewählten Bedingungen bei einer Wellenlänge von 291 nm einer Extinktion von 0,32. Nach Abschluß der Reaktion mit 2-PAM und o-Nitrophenylbutyrat als Substrat fanden wir bei einem eingesetzten Gehalt von 5 μg in der Untersuchungslösung den Extinktionswert von 0,21. Das Verhältnis der beiden Extinktionen betrug etwa 1,5 : 1.

Nach dem Alkalisieren beider Untersuchungslösungen mit conc. NaOH fanden wir bei dem Vergleich der Extinktionswerte das gleiche Verhältnis.

Das bedeutet, wenn am Anfang der Reaktion bei der Spaltung von o- Nitrophenylbutyrat durch 2-PAM noch 1,5 Mol 2-PAM nachzuweisen war, so lag nach Abschluß der Reaktion nur noch 1 Mol 2-PAM vor. Da wir dieselben Verhältnisse auch bei den Absorptions-Spektren nach Alkalisieren der Lösung fanden, konnte man annehmen, daß ein Drittel der eingesetzten 2-PAM-Menge im Laufe der Reaktion verbraucht wurde.

VI. Versuche zur Extrahierbarkeit der Reaktionslösung

Nach der papierchromatographischen Auftrennung der Reaktionslösung und der UV-spektrophotometrischen Untersuchung der einzelnen Fraktionen lag die Annahme nahe, daß in der Reaktionslösung ein Gemisch verschiedener Substanzen vorliegt. Daher versuchten wir mit mehreren Extraktionsmitteln die in der Reaktionslösung vorliegenden Stoffe zu isolieren.

1. Versuche mit verschiedenen Extraktionsmitteln

Eine Reaktionslösung aus 325 mg (1,235mM) 2-PAM und 172 mg (0,824 mM) o- Nitrophenylbutyrat in 20ml Butanol-Phosphat-Puffer wurde mit 2 n Essigsäure sauer gemacht und in einen Scheidetrichter überführt.

Dann wurden folgende Extraktionsmittel getestet:
Äther, Chloroform, Methylenchlorid, Toluol, Amylacetat, Athylacetat, n-Hexan und 1,2 Dichloräthan.

Vor der Beurteilung der einzelnen Extraktionsmittel wurde die Reaktionslösung im UV-Spektrophotometer unter denselben Bedingungen wie nach einer papierchromatographischen Auftrennung gemessen, also mit 0,5 n H_2SO_4 auf die geeignete Konzentration verdünnt.

Vergleich: 0,5 n H_2SO_4 ; Meßbereich: 360 - 220 nm;
Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur

Absorptionsmaxima: 291 nm, 277 nm, 269 nm, 222 nm

Absorptionsminima: 286 nm, 251 nm, 209 nm

Auf Grund dieses UV-Spektrums schlossen wir, daß in der Reaktionslösung nach Abschluß der Reaktion ein Gemisch vorliegt.

Von den getesteten Extraktionsmitteln waren für die Reaktionslösung nicht brauchbar die organischen Lösungsmittel: Äther, Toluol und n-Hexan, weil nach anschließender UV-Kontrolle keine Substanz in die organische Phase ging.

Mit 1,2 Dichloräthan und Äthylacetat waren die Substanzen extrahierbar, welche das zusammengesetzte UV-Spektrum ergaben; die Wasserphase wies aber ebenso das gleiche UV-Spektrum auf.

Für unsere Untersuchungen erwies sich Methylenchlorid am geeignetsten.

2. Untersuchung der filtrierte Reaktionslösung durch Extraktion mit Methylenchlorid

Von einem frisch bereiteten Reaktionsansatz mit 395 mg (1,5 mM) 2-PAM und 209 mg (1 mM) o-Nitrophenylbutyrat in 50 ml Butanol-Phosphat-Puffer wurde nach Abfiltrie-

ren der ausgefallenen Kristalle je 15 ml für drei Analysen verwendet. Dabei wurde bei $\text{pH} = 3$ (durch Zugabe von 2n Essigsäure), bei $\text{pH} = 5$ (unveränderte Lösung) und bei $\text{pH} = 7$ (durch Zugabe von 2n NaOH) untersucht.

Die 15 ml der Reaktionslösung wurden mit pH-Werten 3, 5 und 7 in einen Schütteltrichter überführt und je zweimal mit dem doppelten Volumen Methylenchlorid extrahiert. Die Wasserphase und die über Na_2SO_4 getrocknete organische Phase wurden in ein Schälchen filtriert; über dem Wasserbad wurden die Lösungen vorsichtig eingedampft.

a) Ergebnisse der UV-spektrophotometrischen Untersuchung

Ein Teil der Schälchenrückstände der Wasserphase bei den pH-Werten 3, 5 und 7 wurde in 0,5n H_2SO_4 gelöst und gegen 0,5n H_2SO_4 als Vergleich gemessen.

Meßbereich: 360 - 220 nm; Schichtdicke: 1 cm;

Raumtemperatur

Es zeigte sich bei allen drei pH-Werten ein identischer Kurvenverlauf:

Absorptionsmaxima: 291 nm, 277 nm, 270nm, 222 nm

Absorptionsminima: 286 nm, 251 nm

Nach Alkalisieren mit conc. NaOH ergab sich ein UV-Spektrum wie es für das reine 2-PAM charakteristisch ist, nämlich das Absorptionsmaximum bei 333 nm, das Absorptionsminimum bei 252 nm.

Dieselben Ergebnisse erhielt man, wenn die Rückstände statt in 0,5n H_2SO_4 in Aqua dest. gelöst und gegen Aqua dest. als Vergleich gemessen wurden.

Die Schälchenrückstände der organischen Phase, die im Vergleich zum Rückstand aus der Wasserphase viel geringer waren, wurden im UV-Spektrophotometer unter gleichen Meßbedingungen untersucht. Hier unterschieden sich die UV-Kurven entsprechend dem pH-Wert, mit dem die Reaktionslösung mit Methylenchlorid extrahiert wurde.

Die UV-Kurve - bei pH = 3 extrahiert - zeigte mit ihrem Absorptionsmaximum bei 277 nm und bei 270 nm die größte Ähnlichkeit zur unveränderten Reaktionslösung. Das Fehlen des Absorptionsmaximums bei 291 nm, welches für das Vorhandensein von 2-PAM charakteristisch ist, macht es wahrscheinlich, daß z.B. keine stabile Verbindung zwischen 2-PAM und einer anderen Substanz vorliegt.

Die UV-Kurven bei den pH-Werten 5 und 7 wichen mit ihren Absorptionsmaximas nur um einige nm von der eben genannten ab. Die UV-Kurve - bei pH = 5 extrahiert - hatte ihr Absorptionsmaximum bei 268 nm, die UV-Kurve - bei pH = 7 extrahiert - bei 275 nm.

Trotz allem lassen sich mit diesen Extraktionen mit Methylenchlorid keine eindeutigen Schlüsse auf die Zusammensetzung der Reaktionslösung ziehen.

Durch papierchromatographische Auftrennung der Wasserphase und der organischen Phase der unveränderten Reaktionslösung - pH = 5 - mit Methylenchlorid als Extraktionsmittel sollten die einzelnen Bestandteile der beiden Phasen weiter aufgeschlüsselt werden.

b) Papierchromatographische Auftrennung der beiden Phasen, gewonnen durch Extraktion der unveränderten Reaktionslösung mit Methylenchlorid

Die Rückstände wurden wie oben beschrieben durch Eindampfen über dem Wasserbad gewonnen, nachdem vorher die organische Phase von der Wasserphase mit einem Scheidetrichter getrennt und über Na_2SO_4 getrocknet in ein Schälchen filtriert wurde. Die so erhaltenen Rückstände der Wasserphase und der organischen Phase wurden in Äthanol gelöst und auf ein Papierchromatogramm aufgetragen. Als Vergleich wurde o- Nitrophenylbutyrat und 2-PAM ebenfalls in Äthanol gelöst und aufgetragen.

Laufmittel: Butanol-Ameisensäure-Wasser; Laufzeit 15 Stunden.

Bei der Betrachtung des Papierchromatogrammes unter der UV-Lampe findet man über der Startstelle der aufgetragenen organischen Phase nur eine Absorption mit einem R_f -Wert von 0,1, über der Startstelle der aufgetragenen Wasserphase zwei Absorptionen mit einem R_f -Wert von ebenfalls 0,1 und einem R_f -Wert von 0,22.

Zur UV-spektrophotometrischen Untersuchung wurden die unter der UV-Lampe abgegrenzten Absorptionen aus dem Papierchromatogramm ausgeschnitten und jeweils mit 0,5n H_2SO_4 eluiert.

Vergleich: 0,5n H_2SO_4 ; Meßbereich: 360 - 220 nm; Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur

3. Ergebnis

In der organischen Phase fand sich unter diesen Meßbedingungen eine UV-Kurve mit einem Absorptionsmaximum bei 267 nm und einem Absorptionsminimum bei 238 nm.

Dieses Absorptionsspektrum ähnelt dem UV-Spektrum eines Picolinsäurederivates, welches - wie später näher beschrieben wird - bei einer eventuellen Beckmannschen Umlagerung von 2- PAM entstehen könnte. Eine sichere Aussage läßt sich jedoch nicht machen. In der Wasserphase deckt sich die UV-Kurve der Fraktion mit dem R_f -Wert von 0,1 mit der organischen Phase. Die UV-Kurve der zweiten Fraktion mit dem R_f -Wert von 0,22 hat ihr Absorptionsmaximum bei 291 nm, ihr Absorptionsminimum bei 257 nm. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit dem Vergleichsspektrum des reinen 2-PAM.

VII. Theoretische Überlegungen über den Umbau von 2- PAM

Durch quantitative Untersuchungen der 2- PAM-Menge vor der Reaktion mit o- Nitrophenylbutyrat als Substrat und nach Abschluß der Reaktion ging hervor, daß ein Drittel der eingesetzten 2- PAM-Menge aus dem Reaktionsansatz verschwand.

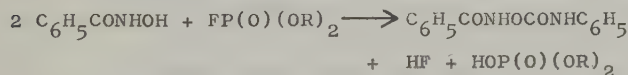
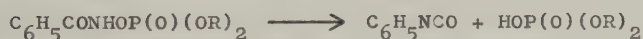
1. Vorbemerkung

In der Dissertationsschrift von Kaiser (1964) konnte in orientierenden Versuchen die direkte Abhängigkeit zwischen eingesetzter 2- PAM-Menge und freigesetzter o- Nitrophenol-Menge bei 4 - 40fachen Überschuß an o- Nitrophenylbutyrat festgestellt werden. Die Autorin folgerte daraus, daß bei der Hydrolyse von o- Nitrophenylbutyrat 2- PAM verbraucht wird und somit nicht als echter Katalysator wirkt. Bei Annahme einer solchen eher stöchiometrischen Beziehung zwischen 2- PAM und o- Nitrophenylbutyrat ist diese hydrolytische Katalyse den von Hackley, Plapinger, Stolberg und Wagner-Jauregg (1955) gefundenen Ergebnissen sehr ähnlich.

Diese Autoren fanden, daß bei der Freisetzung von 1 Mol Fluorwasserstoff aus Diisoproylfluorophosphat (DFP) in Gegenwart verschiedener Hydroxamsäuren 1,5 - 2 Mol der letzteren aus dem Reaktionsansatz verschwanden. Sie folgerten daraus, daß die Hydroxamsäuren nicht als echte Katalysatoren die Hydrolyse-Reaktion beschleunigen, sondern selbst hierbei verändert werden.

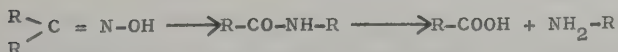
Das Reaktionsprodukt zwischen DFP und Benzohydroxamsäure wurde isoliert und konnte als o- Phenylcarbamylbenzohydroxamat $C_6H_5CONHOCONHC_6H_5$ identifiziert werden.

Die Autoren geben für den Reaktionsablauf folgende Gleichungen an:



2. Beckmann-Umlagerung

Nach theoretischen Überlegungen könnte bei 2- PAM ein Umbau im Sinne einer Beckmannschen Umlagerung eintreten (Houben-Weyl (1957), Klages (1957), Goulds (1962)):



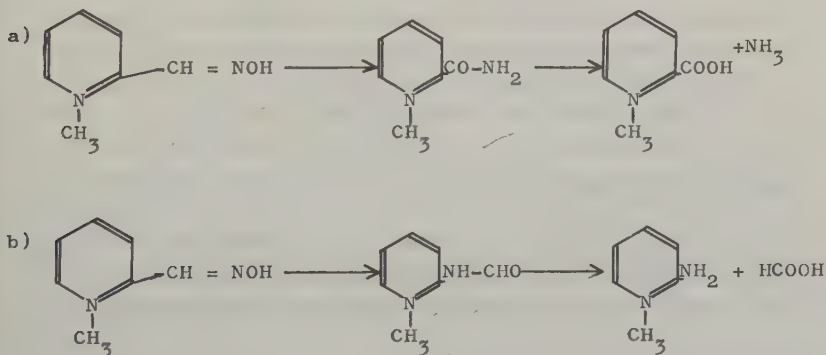
Diese Reaktion tritt bei Ketoximen unter dem Einfluß z.B. von konzentrierter Schwefelsäure oder Phosphor-

Die aus dem Oxim (a) erzeugte Verbindung (b) ist nichts anderes als die "Enolform" eines Säureamids; die Formel des Umlagerungsproduktes kann auch durch (c) wiedergegeben werden (Karrer 1950).

Horning und Stromberg konnten zeigen, daß sich auch Aldoxime wie Ketoxime in Säureamide umlagern lassen (Karrer 1963).

Tritt nun beim 2- PAM die Beckmannsche Umlagerung in der so formulierten Weise ein, so müßten in der Reaktionslösung aus 2- PAM und o- Nitrophenylbutyrat die beiden Endprodukte a) Picolinsäure und b) 2-Aminopyridin, jeweils am Stickstoffatom des aromatischen Ringes methyliert, vorliegen.

Formelmäßige Darstellung der Beckmannschen Umlagerung beim 2- PAM:



Diese Darstellung ist allerdings nur eine Hypothese. Um zu prüfen, ob Umlagerung und Abbau von 2- PAM in diesem Sinne abläuft, wurde Picolinsäure ($C_6H_5ON_2$) und 2-Aminopyridin ($C_5H_6N_2$) untersucht und ihre UV-Spektren mit den UV-Spektren verglichen, die man aus den einzelnen Fraktionen durch papierchromatographische Auftrennung der Reaktionslösung erhalten hatte.

VIII. Untersuchung von Picolinsäure und 2-Aminopyridin

1. UV-spektrophotometrische Untersuchung von Picolinsäure und 2-Aminopyridin

Von den beiden Substanzen Picolinsäure und 2-Aminopyridin wurden je eine Lösung in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$ 0,5n H_2SO_4 hergestellt und im UV-Spektrophotometer gemessen.

Meßbereich: 360 - 220 nm; Vergleich: 0,5n H_2SO_4 ;
Schichtdicke: 1 cm; Raumtemperatur

a) Picolinsäure:

Absorptionsmaxima: 270 nm, 263 nm

Absorptionsminimum: 237 nm

Beim alkalisch machen der Untersuchungslösung mit conc. NaOH bleibt das Absorptions-Spektrum in seinem Kurvenverlauf unverändert.

b) 2-Aminopyridin:

Absorptionsmaxima: 296 nm, 226 nm

Absorptionsminimum: 246 nm

Beim Alkalisieren der Untersuchungslösung mit conc. NaOH zeigt das Absorptions-Spektrum folgenden Verlauf:

Absorptionsmaxima: 286 nm, 222 nm

Absorptionsminimum: 254 nm

2. Auswertung der Ergebnisse

Die Absorptions-Spektren von Picolinsäure und 2-Aminopyridin wurden mit den Absorptions-Spektren der Frak-

tionen verglichen, die wir nach papierchromatographischer Auftrennung der Reaktionslösung aus 2- PAM und o- Nitrophenylbutyrat in Butanol-Phosphat-Puffer und Elution aus den verschiedenen absorbierenden Flecken gewinnen konnten.

Dabei fiel eine starke Ähnlichkeit des Absorptionsspektrums der Picolinsäure mit dem Absorptionsspektrum des Eluates aus der Fraktion mit einem R_f -Wert 0,47 bei Butanol-Ameisensäure-Wasser als Laufmittel auf. Ebenso verhielt es sich mit dem Absorptionsspektrum des 2-Aminopyridin im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des Eluates aus der Fraktion mit einem R_f -Wert 0,73. Nach papierchromatographischer Charakterisierung der Reinsubstanzen Picolinsäure und 2-Aminopyridin stimmen die entsprechenden R_f -Werte unter gleichen Bedingungen annähernd überein:

Die Absorptionskurve des Eluates aus den Flecken mit einem R_f -Wert von 0,07 und 0,16 desselben Chromatogrammblasses sind charakterisiert durch ein UV-Spektrum, das bei 277 nm einen Buckel und das Maximum bei 270 nm hat. Dieselbe Gruppierung um 7 nm verschoben, also bei 270 nm und 263 nm, tritt bei der Picolinsäure auf.

Diese orientierenden Untersuchungen lassen eine derartige Umsetzung von 2- PAM in Picolinsäure und 2-Aminopyridin im Sinne einer Beckmannschen Umlagerung möglich erscheinen.

F) Diskussion

=====

Bei der Spaltung von o- Nitrophenylbutyrat durch 2- PAM bei einem pH-Wert 7,6, welche Geldmacher-v. Mallinckrodt und Kaiser (1968) bei der Überprüfung der Leistungsfähigkeit der von Main, Miles und Braid (1961) mitgeteilten Methode zur Cholinesteraseaktivitätsbestimmung im Blutserum mit o- Nitrophenylbutyrat als Substrat für forensische Zwecke feststellte, fanden wir folgende Verhältnisse vor:

Nach Abschluß der Reaktion zwischen 2- PAM und o- Nitrophenylbutyrat im molaren Verhältnis von 1,5 zu 1 in Butanol-Phosphat-Puffer pH 7,6 fiel ein Niederschlag aus, der als o- Nitrophenol identifiziert werden konnte (Abb. 1 und 2).

Nach Filtration des o- Nitrophenol untersuchten wir die Reaktionslösung mittels Papierchromatographie, wobei wir die Laufmittel Butanol-Ammoniak und Butanol-Ameisensäure-Wasser benutzten und eine Laufzeit von 15 bzw. 45 Stunden wählten. Durch UV-spektrophotometrische und IR-spektrophotometrische Untersuchungen konnte nur unverändertes 2- PAM sicher nachgewiesen werden (Abb. 4 und 5).

Außer dem Filtrat und einem Teil unveränderten 2- PAM konnten wir aber mit letzter Sicherheit keine weiteren Reaktionsprodukte oder 2- PAM-Derivate identifizieren. Daß grundsätzlich eine Isolierung und Charakterisierung auf Grund papierchromatographischer Auftrennung ein schwieriges Problem darstellt, konnte von Way, Brady und Tong (1966) gezeigt werden. Die Autoren legten dar, daß 2- PAM in Gegenwart verschiedener

Anionen deutlich unterschiedliche chromatographische Eigenschaften besitzt. Zudem können die R_f -Werte eines einzigen Pyridiniums in einer Lösung zusammen mit zwei verschiedenen Anionen in einem weiten Bereich differieren. Die Folge würde sein, daß jedes dieser Pyridinium-Kationen in einer solchen Lösung in getrennten Fraktionen eines einzigen Papierchromatogrammes vorliegen würde. Auf Grund dieses Phänomens der vielfachen Flecke warnen die Autoren davor, die "Isolation" eines neuen Produktes anzunehmen, besonders dann, wenn andere Verfahren zur Charakterisierung der fraglichen Substanzen nicht geeignet sind.

Eine weitere Schwierigkeit, 2- PAM und seine Metaboliten auf Grund seiner Absorptions-Spektren zu kennzeichnen, ergibt sich aus seinem Verhalten bei verschiedenen Konzentrationen. Der Kurvenverlauf zeigt in alkalischer Lösung ein Absorptionsmaximum zwischen 330 nm und 360 nm, das in saurer Lösung nicht vorhanden ist (Schoene 1968). Dieses Absorptionsmaximum beim 2- PAM (332 nm) läßt sich auf die Betainstruktur zurückführen. Mit zunehmender Konzentration wird diese Betainbande aufgespalten, die neuen Maxima werden mit wachsender Konzentration bathochrom verschoben.

Erfolgt ein Umbau von 2- PAM im Sinne einer Beckmannschen Umlagerung, so können unter anderem Derivate von Picolinsäure und 2- Aminopyridin auftreten. Nimmt man einen solchen Mechanismus an, so könnte bei der Spaltung von o- Nitrophenylbutyrat durch 2- PAM unter den beschriebenen Bedingungen folgendes stattfinden:

O- Nitrophenylbutyrat wird vollständig in o- Nitrophenol und Buttersäure gespalten; dabei bleiben

zwei Drittel der eingesetzten 2- PAM Menge unverändert, d.h. die der eingesetzten Menge an Substrat entsprechende molare Menge, während sich ein Drittel des 2- PAM in ein Picolinsäure- und 2-Aminopyridin-Derivat, jeweils am Stickstoffatom des aromatischen Ringes methyliert, und in den verschiedenen Zwischenstufen im Sinne einer Beckmannschen Umlagerung wiederfindet. Die bei der Reaktion freiwerdende Buttersäure könnte diese Umlagerung unterstützen.

Eine Zwischenverbindung, wie sie von den Autoren Hackley, Plapinger, Stolberg und Wagner-Jauregg (1955) bei der Hydrolyse von Diisopropylfluorphosphat (DFP) in Gegenwart verschiedener Hydroxamsäuren gefunden wurde, konnte bei der von uns untersuchten Reaktion nicht isoliert werden. Wenn auch bei der Hydrolyse von o-Nitrophenylbutyrat durch 2- PAM eine Zwischenverbindung nicht auszuschließen ist, denn in der Mutterlauge liegt neben reichlich 2- PAM noch eine Anzahl anderer, nicht identifizierbarer Umbauprodukte vor, so liegt hier offenbar ein anderer Reaktionsablauf vor, unter Umständen mehr im Sinne einer echten Katalyse.

G) Zusammenfassung
=====

In eigenen Versuchen wurde die Reaktion von 2- PAM und o- Nitrophenylbutyrat bei einem pH-Wert 7,6 geprüft.

Dabei spaltet 2- PAM in Butanol-Phosphat-Puffer (pH-Wert 7,6) o- Nitrophenylbutyrat in o- Nitrophenol und Buttersäure.

O- Nitrophenol wurde durch sein Absorptions-Spektrum mit dem Infrarot-Spektralphotometer charakterisiert. Aus der Reaktionslösung konnten wir unverändertes 2- PAM isolieren und mit dem Infrarot-Spektralphotometer identifizieren.

Andere Reaktionsprodukte oder 2- PAM-Metabolite waren unter unseren Bedingungen nicht zu identifizieren.

Ein Umbau des 2- PAM im Sinne einer Beckmannschen Umlagerung ist wahrscheinlich.

H) Literaturverzeichnis

=====

ALGERI, E. J. and WALKER, J. T.

Paper chromatography for identification of the common barbiturates.

Amer. J. Clin. Path. 22, 37 (1952)

AMMON, R.

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflügers Arch. Physiol. 233, 486 (1934)

FRIEDBERG, K. D. und F. SAKAI

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (PAM).

Dtsch. Zeitschr. f. ger. Med. 47, 580 (1958)

GATTERDAM, P. E., J. E. CASIDA and D. W. STOUTAMIRE

Relation of structure to stability, antiesterase activity and toxicity with substituted vinyl phosphate insecticides.

J. Econ. Entomol. 52, 270 (1959)

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M. und I. KAISER

Die Verwendung von o-Nitrophenylbutyrat als Fehlerquelle bei der Messung der Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM.

Klin. Chem. 6, 141 (1968)

GOULDS, E.

Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie.

Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstraße (1962)

GREEN, A. L. and B. SAVILLE

The reaction of oximes with isopropyl methylphosphorofluoridate (sarin).

J. Chem. Soc. (London) 1956/III, 3887

GREEN, A. L., G. L. SAINSBURY, B. SAVILLE and
M. STAINFIELD

The reactivity of some nucleophilic reagents with organophosphorous anticholinesterases.

J. Chem. Soc. (London) 1958/II, 1583

HACKLEY, B. E., Jr., R. PLAPINGER, M. STOLBERG and
T. WAGNER-JAUREGG

Acceleration of the hydrolysis of organic fluorophosphates with hydroxamic acids.

J. Am. Chem. Soc. 77, 3651 (1955)

HAGEDORN, I., W. H. GÜNDEL und K. SCHOENE

Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholin-Esterase mit Oximen: Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes.

Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf) 19, 603 (1969)

HORNING und STROMBERG

Zit. Karrer (1963)

HOUBEN-WEYL, E.

Methoden der organischen Chemie.

4. Auflage Band XI/I, Stickstoffverbindungen II

Georg Thieme Verlag - Stuttgart, 892 (1957)

HURD, Ch. D. and L. BAUER

A novel rearrangement of hydroxamic acids using sulfonyl chlorides.

J. Amer. Chem. Soc. 76, 2791 (1954)

JANDORF, B. J.

Chemical reactions of nerve gases in neutral solution. 1. Reactions with hydroxylamine.

J. Amer. Chem. Soc. 78, 3686 (1956)

JATZKEWITZ, H.

Ein klinisches Verfahren zur Bestimmung von basischen Suchtmitteln im Harn

Z. Physiol. Chem. 292, 94 (1953)

KAISER, I.

Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität mit o-Nitrophenylbutyrat; Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Methode.

Dissert. Univ. Erlangen-Nürnberg, 1964

KARRER, P.

Lehrbuch der organischen Chemie.

Georg Thieme Verlag - Stuttgart, S. 541 (1950)

11. Auflage

KARRER, P.

Lehrbuch der organischen Chemie.

Georg Thieme Verlag - Stuttgart, S. 548 (1963)

14. Auflage

KLAGES, F.

Lehrbuch der organischen Chemie. Band II.

Walter de Gruyter & Co, Berlin S. 351 (1957)

2. Auflage

KOELLE, G. B.

Zit. Stumpf 1956

J. Pharmacol. 100, 158 (1950)

MAIN, A. R., K. E. MILES and P. E. BRAID

The determination of human serum - cholinesterase activity with o-nitrophenyl butyrate.

Biochem. J. 78, 769 (1961)

MEISENHEIMER

Zit. Karrer (1950)

SCHOENE, K.

Das Verhalten von N-Alkyl-pyridiniumaldoximen in wäßrig-alkalischer Lösung.

Arzneimittelforsch. 18, 1350 (1968)

STOLBERG, M. A., TWEIT, R. C., STEINBERG, G. M. and WAGNER- JAUREGG, T.

The preparation of o- Phenylcarbamylbenzohydroxamate through the lossen rearrangement

J. Amer. Chem. Soc. 77, 765 (1955)

STUMPF, Ch.

Methoden zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität im Blut.

Ztschr. Vitamin-, Horm.-, Ferment-Forschg. 8, 36 (1956)

SUCKER, H.

Enzymatische Methoden. In: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte, Bd. II. Hrsgeb.

E. Graf und Fr. Preuss. Van den Hoek und Rupprecht, Göttingen (1966) 3. Auflage

WAGNER-JAUREGG, T.

Experimentelle Chemotherapie von durch phosphorhaltige Anti-Esterasen hervorgerufenen Vergiftungen.

Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf) 6, 194 (1956)

WAGNER-JAUREGG, T. and B. E. HACKLEY Jr.
Model reactions of phosphorous-containing enzyme
inactivators. III. Interaction of imidazole,
pyridine and some of their derivatives with
dialkyl.

J. Amer. Chem. Soc. 75, 2125 (1953)

WAY J. L., W. T. BRADY and H. S. TONG
Multiple spot phenomena of 2- PAM and metabolite
on paper chromatograms.

J. Chromatog., 21, 280 (1966)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt bedanke ich mich besonders für die Überlassung des Themas und für ihre stets in übergroßem Maße gewährte freundliche Hilfe.

Lebenslauf

Am 4. 2. 1945 wurde ich, Dieter Christian Wenzel, als Sohn des Arztes Dr. Rupert Wenzel und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Schicketanz, in Reichenberg geboren.

Seit 1945 in Erlangen wohnhaft, trat ich 1950 in die Volksschule ein, 1955 in das Städtische Realgymnasium und erhielt dort am 20. 7. 1965 das Zeugnis der Reife.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich im März 1968 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1968/69 wechselte ich an die Universität Wien, ein Semester später an die Freie Universität Berlin.

Seit dem Wintersemester 1969/70 studierte ich wieder an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich am 14. 7. 1971 das Medizinische Staatsexamen bestand.

Erlangen, Juli 1971

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990